

Annex 8a

I/12

**PROJET
BIOMUSIQUE, RESONANCE et GENETIQUE**

PROTOCOL E I-MCI

REGULATION EPIGENETIQUE DE SYNTHESE DE PROTEINES *IN VITRO* DANS DES CELLULES HUMAINES EN CULTURE, SOUS L'ACTION D'UN SIGNAL SONORE

présenté à l'

**INSTITUT INTERNATIONAL DE RECHERCHE SUR LES
THERAPIES INFORMATIONNELLES (2IRTI) - Bruxelles -**

par :

**M.C. LANG
M. LEMPEREUR**

application du Brevet n° 9206765 (titulaire : Joël STERNHEIMER)

JUIN 2000

Rev. 06/00

PROTOCOLE MOI JUN 2000**REGULATION EPIGENETIQUE DE SYNTHESE DE PROTEINES *IN VITRO* DANS DES CELLULES HUMAINES EN CULTURE, SOUS L'ACTION D'UN SIGNAL SONORE - application du Brevet n°9206765 (titulaire: Joel Sternheimer)****Principe de l'expérience**

Soumettre à une onde acoustique informative un ensemble de cellules humaines cultivées *in vitro* à 37°C sous atmosphère de 5% de CO₂. Les divers paramètres tels que la succession de fréquences, la durée, le nombre d'écoute dans le temps, l'additivité des signaux, le milieu de propagation (- air/eau - eau/eau -) seront déterminés d'après le principe de régulation épigénétique de la synthèse des protéines (Brevet J. Sternheimer). L'application de la succession des fréquences sonores correspondant à la succession des acides aminés d'une protéine est susceptible d'en provoquer la synthèse *in situ* au sein de l'organisme intégré auquel il est soumis - réciproquement une succession de fréquences en «contrepoint» (plus précisément, en symétrie harmonique) est susceptible d'en inhiber la synthèse.

Après application du signal sonore correspondant à une protéine cellulaire, nous suivrons *in situ* au niveau moléculaire au sein des cellules réceptrices en culture, la réponse (si elle existe) provoquée par le signal. Nous espérons ainsi stimuler la synthèse de la protéine correspondant à l'information contenue dans le signal sonore.

Ce protocole d'étude est généralisable à toute séquence sonore correspondant à toute protéine pourvu que l'on en connaisse la séquence en acides aminés ainsi que (de préférence) un moyen (simple) de dosage.

But de l'expérience

Nous avons choisi d'étudier l'effet de tels sons sur des cellules humaines cultivées *in vitro* -

L'expérience a pour but premier, de vérifier, et/ou de mesurer à partir de quelle concentration, des cellules, - sorties de leur contexte organique - sont néanmoins capables de réagir à de tels signaux. Quel qu'en soit le résultat, il sera informatif quant à la caractérisation physique de la propagation du phénomène notamment en terme d'onde d'échelle.

Si l'expérience valide l'existence d'un tel effet, de multiples conséquences sont à envisager ; citons par exemple la possibilité de tests *in vitro* pour établir les propriétés biologiques de protéines inconnues et/ou vérifier les prédictions théoriques correspondantes. De plus, s'il y a une concentration minimale à partir de laquelle s'observe le phénomène, c'est que les cellules émettent à leur tour les ondes prévues par la théorie et sont en interaction mutuelle, avec une potentiation des effets.

Nous avons porté notre choix pour cette première expérience sur une succession de séquences sonores correspondant à des protéines effectrices d'apoptose ou mort cellulaire. Le protocole exposé ci-après est dorénavant et déjà opérationnel, des expériences de mise au point ayant permis de dégager les paramètres qui paraissent les plus pertinents à étudier, et notamment l'importance de la concentration cellulaire lors de l'exposition acoustique.

Extension à d'autres champs d'étude.

Une expérience ainsi conçue nous permettra d'aborder plusieurs champs d'étude, en particulier

1. Validation de la prédiction de fonctions biologiques.
La production *in situ* dans la cellule, de protéines douées d'activités biologiques aura des conséquences sur les voies métaboliques qui en procède. Une évaluation (au niveau de l'ARN) du taux d'expression des gènes correspondants ainsi impliqués dans ces voies métaboliques, sera possible grâce à la technique des DNA-Chips que nous nous proposons de mettre en œuvre à long terme.
2. L'élaboration de tests *in vitro* comme élément de validation des potentialités thérapeutiques.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

MATERIEL

1- Equipements :

- une hotte à flux laminaire,
- deux incubateurs 37°C, nommés respectivement I₁ I₂ (I₁ avec équipement électroacoustique)
- un amplificateur marque: Technics- Type SUV 300,
- un lecteur de cassettes- (auto-reverse) Aiwa- Type TA353,
- un haut parleur immergeable marque: Rolen Star 25W,
- une cassette audio possédant les séquences sonores d'intérêt,
- un microscope,
- un analyseur de cellules - FACS,
- un lecteur de plaque ELISA,
- appareil d'électrophorèse horizontal.

2- Echantillons biologiques :

Cellules humaines immortalisées en lignée continue -

choix de la lignée

- tumorales ou non,
- adhésives sur le flacon de culture ou en suspension dans le milieu de culture.

Cellules non humaines : étude musico-phylogénétique.

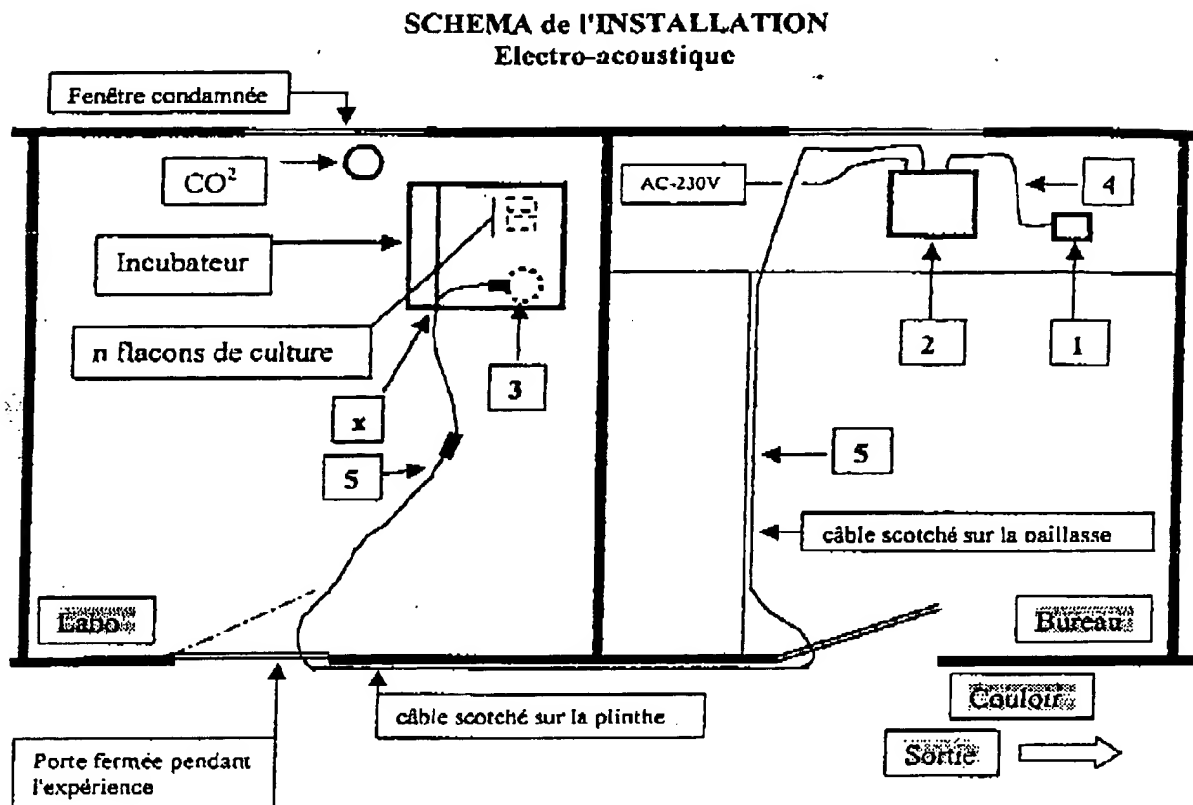
2- Consommables

- bromure d'éthidium,
- agarose
- le milieu de culture RPMI 1640,
- du sérum de veau fœtal,
- CO₂,
- des antibiotiques,
- des colorants :
 - . giemsa
 - . bleu trypan,
- de l'eau de Javel,
- des flacons de culture en plastique,
- du matériel de pipetage,
- des pipettes.

Remarques :

- la réalisation de cette expérience nécessite que la culture cellulaire se fasse dans des conditions stériles,
- le choix de la séquence sonore ainsi que de la lignée de cellules sont fonction de la synthèse protéique que l'on veut réaliser,
- il est nécessaire pour la production protéique par la cellule que celle-ci en possède l'information sous forme d'acide nucléique.

Dispositif opérationnel au stade préliminaire (réalisation 1999)



- LEGENDE - Matériel électro acoustique		
Repère	Désignation	Fiche technique MPLOFT99 n°
1	Lecteur de cassettes auto-reverse	1
2	Amplificateur	3
3	Haut parleur sous marin	2
4	Liaison lecteur de cassette / amplificateur	6.1
5	Liaison amplificateur / haut parleur	6.2.0
6	Silicone	7.1

■ Raccordements (haut-parleur) - protection silicone - rep 6 -

x : Pendant diffusion acoustique la traversée de porte de l'incubateur par le câble audio est scotchée
Nota : le labo est équipé d'une hotte à flux laminaire, à côté de l'incubateur.

PROTOCOLE - PRINCIPALES ETAPES**OBSERVATION****I- Culture des cellules en lignée continue**au temps t_0 5 flacons F1 \rightarrow F5

test

5 flacons témoins T1 \rightarrow T5

test

II- A J_0 , au temps t_0 , application du signal sonore pendant 2h dans l'incubateur I_1 sur F1 \rightarrow F5Incubation dans I_1 de T1 \rightarrow T5 pendant 2h sans signal sonore.**III- Le lendemain, à J_1** flacons F1 \rightarrow F5

test

T1 \rightarrow T5

test

- les flacons F1 et T1 sortent de l'expérience et seront suivis pour leurs paramètres biologiques, incubés en parallèle dans l'incubateur I_2 , les jours suivants, à 37° C sous atmosphère de 5% de CO₂.

- refaire l'étape II sur F3 \rightarrow F5

T3 \rightarrow T5**IV- A J_2 , flacons F2 \rightarrow F5**

test

T2 \rightarrow T5

test

- les flacons F2 et T2 sortent de l'expérience et seront suivis pour leurs paramètres biologiques, incubés en parallèle dans l'incubateur I_2 , les jours suivants, à 37°C, sous atmosphère de 5% de CO₂

- refaire l'étape II sur F3 \rightarrow F5

T3 \rightarrow T5**V- A J_3 , flacons F3 \rightarrow F5**

test

T3 \rightarrow T5

test

diluer au 1/3 les cellules, si elles arrivent à confluence.

- les flacons F3 et T3 sortent de l'expérience

- refaire l'étape II sur F4 \rightarrow F5

T4 \rightarrow T5

Les étapes ultérieures, à J_4 et à J_5 , seront identiques à celles réalisées les jours précédents.

A J_6 , arrêt de l'exposition des cellules au signal sonore.

A partir de J_6 , les flacons F1 \rightarrow F5 et T1 \rightarrow T5 sont incubés dans l'incubateur I_2 pendant une semaine supplémentaire à 37° C sous atmosphère de 5% de CO₂.

Pendant cette semaine on suivra les paramètres biologiques.

Remarques :

- Le test comprend :

- une observation au microscope

- numération,

- coloration au bleu trypan et au giemsa

- une analyse par FACS du processus de mort cellulaire,

- électrophorèse - sur gel d'agarose - pour visualiser une éventuelle fragmentation de l'ADN.

- Pendant toute la durée du protocole, les flacons F1 → F5 et T1 → T5 sont incubés dans l'incubateur I₂ à 37°C sous 5% de CO₂, hormis les temps d'incubation dans l'incubateur I₁ où est appliquée la signal sonore.

METHODE (cas de cellules en suspension)

I-A- Vérification de l'incubateur I₁ équipé des éléments électroacoustiques

I-1 stérilité

I-2 Température - CO₂

mettre au moins plusieurs heures au préalable un flacon ouvert de milieu stérile coloré au rouge de phénol pour vérifier le pH

I-3 vérification du taux de CO₂ en présence du haut-parleur, le fil traversant le joint- bien scotcher

I-B- Vérification des cellules avant l'expérience

à J-1, la veille, les «passer» = les diluer pour qu'elles soient en phase exponentielle de croissance le jour de l'expérience - prévoir une concentration équivalente au quart de la saturation (concentration c) - répartir des quantités égales de cellules dans n flacons F_n et dans n flacons T_n correspondants aux n prélèvements qui seront effectués.

à J₀ observation au microscope :

- comptage bleu trypan,
- préparation de lames pour la coloration au giemsa,
- analyse FACS (cycle cellulaire, potentiel de membrane, marquage de l'annexine)

II-III Expérience

J₀

II-1 Vérification du matériel électronique - check piles , son.

II-2 Installer le dispositif électroacoustique - vérifier le niveau sonore.

II-3 Installer n flacons F_n dans l'incubateur I₁

Check up des cellules dans l'incubateur : géométrie,

- repérer :
- les distances entre le haut-parleur et les cellules,
- l'orientation et l'ouverture du bouchon.

II-4 Refermer la porte de l'incubateur et scotcher très hermétiquement le joint d'étanchéité au niveau du fil d'alimentation du haut-parleur.

II-5 Mettre en route le lecteur situé dans une pièce adjacente (temps t₀).

II-6 Vérifier pendant quelques secondes la présence du son.

II-7 Quitter le labo, et la pièce où se trouve lecteur de la bande son.

II-8 Couper le son au temps t₀ + x.

Pour les premiers essais nous opterons pour x = 2 heures, compte tenu du fait que les cellules ne sont pas synchrones et qu'à l'instant t toutes les phases du cycle cellulaire sont présentes dans la population cellulaire - le cycle étant environ de 24 heures - nous estimons qu'une plage de deux heures est une durée minimum nécessaire pour observer le phénomène.

II-9 Observer la couleur du milieu.

II-10 Revisser les bouchons des flacons F_n - enlever le haut-parleur.

II-11 Placer les flacons F_n dans l'incubateur I₂.

Cellules contrôles de l'étape II :

Les cellules contrôles sont appelées cellules naïves (témoins).

Un nombre identique de n flacons Tn (cellules témoins) sera utilisé pour contrôle. Ils seront incubés ensemble pendant la même durée t dans l'incubateur I₁ que chacun des flacons Fn.

J₁

III - le lendemain -

III-1 test des cellules flacons F1, F2 - Fn et T1, T2 - Tn :

- comptage bleu trypan,
- lames coloration au giemsa,
- analyse au FACS.

En fonction de l'observation à J₁, l'étape II de J₀ pourra être répétée à J₁ et ceci plusieurs jours de suite J₂, J₃, J₄.

Nous nommerons, respectivement, F1 le flacon qui aura subi une seule application du signal sonore à J₀, F2 le flacon qui aura subi deux applications du signal sonore à J₀ et J₁, et ainsi de suite.

Il faudra néanmoins prendre en compte la croissance cellulaire qui, si elle n'était pas altérée par le champ sonore, mènerait la culture cellulaire à saturation à J₂ voir J₃, il serait alors nécessaire de diluer la culture.

Nous rappelons que pendant toute la durée du protocole, les flacons F1 → F5 et T1 → T5 sont incubés dans l'incubateur I₂, à 37°C, sous 5% de CO₂ hormis la durée pendant laquelle est appliqué le signal sonore dans l'incubateur I₁.

PARAMETRES A CONSIDERER**1 - Paramètres physiques :**

son :

- succession temporelle de fréquences
 - intensité
 - diffusion sonore : nombre - durée (d) - intervalle
- milieu de propagation
- géométrie du dispositif

2 - Paramètres biologiques :

choix du phénomène à observer :

- est-il gouverné par un ou plusieurs gènes ?
- facilité d'observation

choix de la (succession de) protéine(s) susceptible(s) d'induire le phénomène

choix de la lignée cellulaire (organisme, tissu, cellule tumorale ou non)

choix des conditions de culture :

- concentration cellulaire (c) = distance moyenne entre cellule
- nombre de cellules
- cellules adhérentes ou en suspension.

GENERALISATION DU PROTOCOLE

Le procédé que nous venons de décrire est généralisable à toute induction épigénétique de protéine dont on pourra suivre un dosage adapté.

En particulier l'interféron γ présente un intérêt thérapeutique clairement établi notamment dans le cas de maladies infectieuses. La séquence sonore dans ce cas là correspondrait à la séquence en acides aminés de l'interféron γ . Le test comporterait, outre une visualisation au microscope de la viabilité des cellules par coloration au bleu trypan, un dosage par une technique ELISA commercialisée et disponible auprès de nombreuses sociétés de Biotechnologie.

COMPOSITION de L'EQUIPE EXPERIMENTALE

Marie-Claude Lang	Doct. Es Sc.	Biologiste - Virologue
Michel Lempereur	Ing.	Technique électro-acoustique
- Consultants :		
Guy Frezouls	Doct. Ing.	Biochimiste
H. T. Duc	Doct. Es Sc.	Immunologiste

Compte tenu de l'implication antérieure dans divers projets scientifiques autres que celui-ci, par chacun des membres, nous souhaitons engager un stagiaire titulaire d'un Brevet de Technicien Supérieur qui réaliserait l'expérience sous la Direction de M.C. Lang. Le but de ce stage serait aussi d'engager la formation de personnes compétentes dans le domaine de la bio-acoustique.

Dans un premier temps, une étude préliminaire immédiatement réalisable par le stagiaire à recruter pourrait être conduite dès attribution de l'aide financière sollicitée, dont le montant est précisé ci-après.

MOYENS NECESSAIRES

Nous disposons de tout l'équipement nécessaire (voir schéma de l'installation), toutefois, il est devenu indispensable de procéder à un déménagement et la réinstallation sur un site différent.

Nous estimons que le coût de cette opération s'élèverait à : 13 500 FF

Nous estimons que le coût en matériel consommable s'élèverait à : 3 500 FF

Pour un salaire net d'un emploi jeune, il faudrait prévoir la somme totale de 24.000 FF environ pour un an compte tenu des charges sociales et autres dispositions légales en vigueur.

Montant total de l'aide nécessaire pour réaliser l'expérience : 41 000 FF

Enfin, il serait souhaitable d'établir un contrat de concession de licence avec le Dr. J. Sternheimer

OBLIGATION de COMPTE - RENDU

Toute obtention de subvention par cette équipe, supposera la rédaction sous la responsabilité de M.C. Lang de compte-rendu d'expérience et la communication des résultats aux organismes qui subventionnent le projet.

Toute publication dans des revues spécialisées fera mention de l'origine des crédits attribués à la réalisation du projet.

ANNEXES : CURRICULUM VITAE de M-C. Lang et M. Lempereur

CURRICULUM VITAE

M. C. Lang

Marie-Claude Lang

née le 30 septembre 1948 (Neuilly- France)
adresse: 2-4 Rue Kuss
75013 Paris
tel/Fax 33 1 53 80 21 84
e-mail <marie-claude.lang@brs.ap-hop-paris.fr>

I- ETUDES

Juin 1970	Maitrise de Chimie- Physique
Juin 1971	DEA de Chimie-Physique(mention assez-bien) Université de Paris VI Stage au Laboratoire de Spectroscopie Infrarouge à haute Résolution- Pr. Barchevitz
Juin 1974	Doctorat de 3^{ème} Cycle de Chimie-Physique(mention Physico-chimie Macromoléculaire)-Université de ParisVI Thèse:"Etude de la dynamique des chaines de polyoxyéthylène par marquage de spin" Laboratoire de Physico-chimie Structurale et Macromoléculaire -Pr. Champetier, Pr. Monnerie Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielle-(ESPCI)Paris
Janvier1976 à Mars 1983	Doctorat d'Etat es sciences- Université de Strasbourg Thèse:"Modifications structurales de l' ADN induites par la fixation covalente de cancérogènes"

II - CARRIERE DE RECHERCHE

1971 -1974	Etudiante dans le laboratoire de Physico-chimie Structurale et Macromoléculaire à l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie de Paris
1974-1975	Boursière au Département de Chimie-Physique de l' Université Hébraïque de Jérusalem
1976-1979	Boursière de la Ligue Française contre le Cancer Laboratoire de Biophysique -IBMC- Strasbourg
1979-1982	Attachée de Recherche INSERM Laboratoire de Biophysique- IBMC- Strasbourg
1982-1983	Chargée de Recherche INSERM Laboratoire de Biophysique- IBMC- Strasbourg
1984-1986	Chargée de Recherche INSERM Laboratoire de Mutagenèse et Cancérogénèse CNRS-UPR17 -Dr. R. Devoret
1986-1988	Chargée de Recherche INSERM Unité de Pathologie Moléculaire-Unité 15 INSERM-Paris-Dr.D.Labie
1988-1993	Chargée de Recherche INSERM Unité de Biologie des Rétrovirus -Institut Pasteur-Paris Dr.F.Barré-Sinoussi

1994-1999 Chargée de Recherche INSERM- Responsable de Thématique
Laboratoire d'Oncologie Virale-UPR9045- Dr. Ion Gresser ,Dr.M.G.Tovey
2000- Chargée de Recherche INSERM-
Laboratoire d'Immunopathologie Humaine-Unité 430-INSERM
Pr.M.Kazatchkine

III- ENSEIGNEMENT

1971-1972 Monitorat de Travaux Pratiques en CB-BG-Pr. Fauchère
1972-1973 Assistante vacataire de Travaux Pratiques de Thermodynamique-ESPCI
1973-1974 Assistante vacataire(Physique) en PCEM à l'UER d'Etudes Médicales et
Biologiques (Pr. Jaffrain)-Paris
1988-1992 Enseignement de Travaux Pratiques -Cours de Virologie Médicale
Institut Pasteur-Paris
1992 Enseignement de Travaux Pratiques -Cours de Microbiologie
Institut Pasteur-Paris

Inserm Annex 86

Administration déléguée régionale
Paris VI Saint-Antoine

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

CONVENTION D'ACCUEIL DE PERSONNEL

Entre

l'Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), représenté par Monsieur Claude GRISCELLI, Directeur Général, et par délégation Madame Claudine CHEMLA, Administrateur Délégué Régional, Inserm ADR Paris VI, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 PARIS Cedex 12, agissant pour l'Inserm,

d'une part

Et

L'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, représentée par son Directeur, Monsieur le Professeur Pierre-Gilles DE GENNES,

d'autre part

Il a été arrêté et convenu ce qui suit :

Article 1

Madame Marie-Claude LANG REJZMAN, chargé de recherche à l'Inserm, est amenée à effectuer un travail de recherche de Biophysique moléculaire, utilisant les Installations situées dans le Laboratoire de Physico-Chimie Structurale et Macromoléculaire de Monsieur le Professeur VAN DAMME.

Cette étude se fera sur un an, éventuellement renouvelable, à partir du 25 février 2001

Article 2

Lors de ses missions, Madame Marie-Claude LANG REJZMAN reste placée sous l'autorité de son supérieur hiérarchique, Monsieur le Professeur Michel KAZATCHKINE, Directeur de l'unité 430 Inserm.

Article 3

En matière d'hygiène et de sécurité, Madame Marie-Claude LANG REJZMAN devra se conformer au règlement en vigueur dans le Laboratoire de Physico-Chimie Structurale et Macromoléculaire de Monsieur le Professeur VAN DAMME.

Article 4

En cas de difficulté, le Laboratoire de Physico-Chimie Structurale et Macromoléculaire de Monsieur le Professeur VAN DAMME saisit l'unité 430 Inserm qui seule exerce le pouvoir disciplinaire.

Article 5

En cas d'accident de travail, le Laboratoire de Physico-Chimie Structurale et Macromoléculaire de Monsieur le Professeur VAN DAMME s'engage à prévenir immédiatement l'unité 430, afin de la mettre en mesure d'effectuer les déclarations et formalités requises.

Article 6

Madame Marie-Claude LANG REJZMAN est assurée, à titre privé, par la Compagnie MAIF au travers des garanties responsabilité Civile et Individuelle Accidents (indemnisation sur dommages corporels).

Article 7

En cas de difficulté sur l'interprétation ou l'exécution de la convention, les parties s'efforcent de résoudre leurs différends à l'amiable. En cas de désaccord persistant, il est fait attribution de compétence aux juridictions de Paris.

Fait à Paris, le 23 Février 2001

INSERM

le Salarié

Ecole Supérieure de Physique et
Chimie Industrielles de Paris

Pour le Directeur Général de l'INSERM
Administrateur
Saint Antoine
Signé C. THIEMLA

M. C. Lang

ESPCI
Directeur

Annex 8c

**Institut International de Recherche en Thérapeutique Informationnelle
(2IRTI)**

asbl, n°3544/97 (Annexe au Moniteur Belge du 6 mars 1997)

Dam/Homo p.31

Réunion du mardi 10 octobre 2000 à 12h15

La réunion se tient dans les locaux de l'Institut Paul Lambin (UCL), 43, Clos Chapelle-aux-Champs à Woluwé St Lambert

sont présents:

le Docteur B. Marichal, Président
le Docteur M. Jenaer, Vice-Président-Trésorier
Madame P. Glibert
Me J-L Hirsch
Madame Cl. Lemaire
Monsieur G. Lemaire, Secrétaire

sont excusés:

le Professeur Roberfroid
Monsieur et Madame D.Sacy

Le Docteur Marichal présente un compte-rendu de la réunion de travail tenue le 26 septembre 2000 par le Conseil Scientifique (voir document en annexe)

Protocoles sous le n°1 relatifs au suivi de 15 patients atteints de sclérose en plaque et de 15 patients atteints de la maladie de Parkinson. Le suivi sera élargi à 2x5 patients supplémentaires afin d'avoir un nombre plus significatif dans chaque protocole.

Les dotations à envisager actuellement pour les protocoles 2) et 3) sont trop coûteuses pour le budget du 2 IRTI.

Le protocole sous n°4) concerne un projet présenté par le Dr Lang (INRS France). Concernant l'étude du comportement de cultures cellulaires par étude de la variation de l'interféron gamma il a été détaillé par le Professeur Roberfroid. Le Comité Scientifique considère le projet comme valable. Le Docteur Jenaer a reçu une lettre de Madame Lang demandant à pouvoir rencontrer le Comité Scientifique. Différentes dates seront proposées en accord avec Madame Glibert. Le budget de ce protocole est estimé à 41.000 FF.